

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252052

研究課題名(和文) ヒストンのグリコシル化による栄養膜幹細胞のエピジェネティクス

研究課題名(英文) Epigenetics of trophoblast and embryonic stem cells by a novel histone-glycosylation

研究代表者

塩田 邦郎 (Shiota, Kunio)

早稲田大学・理工学術院・上級研究員(研究院教授)

研究者番号：80196352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH2Aの40番目セリンがN-アセチルグルコサミン化(H2AS40Gc)される新規エピジェネティクス修飾を発見した。栄養外胚葉由来の栄養膜幹細胞(TS細胞)と内部細胞塊由来の胚性幹細胞(ES細胞)は、発生初期の分化運命機構に重要な示唆を与えてきた。本研究では、H2AS40Gcがこれら幹細胞の緩んだクロマチン領域に豊富で、分化に伴い大きく変化し、遺伝子発現に促進的であること、またグルコース感受性およびゲノム修復機能を有することを明らかにした。H2AS40Gcは代謝とゲノム正常性維持を結ぶエピジェネティクス系で、脊椎動物から哺乳類への進化上重要な位置に存在するなど、予想以上の成果となった。

研究成果の概要(英文)：We discovered O-linked-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of histone H2A at Serine 40 (H2AS40Gc). The H2AS40Gc site is in the L1 loop structure where two H2A molecules interact in the nucleosome. The novel O-GlcNAcylation is specific to the Serine 40 isoforms, which emerged in Marsupialia and persisted thereafter in mammals. Targets of H2AS40Gc are distributed genome-wide and are dramatically changed during the differentiation in mouse trophoblast stem cells. The level of H2AS40Gc is also responsive to glucose level and DNA damage. Intriguingly, hyper-H2AS40Gc induced by changing glucose level or the overexpression of the H2A3 Serine 40 isoform protected the genome from DNA damage in mouse embryonic stem cells. Thus the H2AS40Gc functions DNA damage repair. Based on these data, the emergence of H2A Serine 40 and its O-GlcNAcylation linked a genetic event to genome-wide epigenetic events that correlate with the evolution of placental animals.

研究分野：農学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 H2A-アセチルグルコサミン(GlcNAc)修飾 ゲノム修復 グルコース感受性 栄養膜幹細胞 胚性幹細胞 進化

### 1. 研究開始当初の背景

内部細胞塊と栄養外胚葉への分化は、受精後に最も早期に起きる現象である。栄養外胚葉に由来する栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は、内部細胞塊に由来する胚性幹細胞 (ES 細胞) とは著しく異なった特徴的細胞である。TS 細胞は胎盤栄養膜細胞系列にのみ分化するのに対して、ES 細胞は通常の培養下では栄養膜細胞に分化することは無い。この初期胚由来細胞の厳密な分化運命の制御はエピジェネティクス制御による。申請者らはヒストン H2A の 40 番目のセリンの GlcNAc 修飾 (H2AS40Gc) を発見した。研究開始当初、ヒストンの GlcNAc 修飾はグルコース代謝とゲノム制御の接点となる新たなエピジェネティクス制御系として注目されていたが、特異抗体が作製・市販されていないこともあって解析が困難であった。

### 2. 研究の目的

新規ヒストン GlcNAc 修飾 H2AS40Gc の生物学的な意義を明らかにすることが目的である。

(1) H2AS40Gc 標的ゲノム領域を決定する。インフォマティクス解析を行い、遺伝子領域、非遺伝子領域、遺伝子の種類などの H2AS40Gc の特徴を明らかにする。

(2) H2AS40Gc ゲノム・ワイド標的の情報と既知のヒストン修飾情報との関係を知ることが、機能を推定する上で重要である。(1) の H2AS40Gc データをこれまでに集積されているエピゲノム情報 (DNA メチル化情報や様々なヒストン修飾情報) に重ね合わせることで GlcNAc 修飾の役割を浮上させる。

(3) 幹細胞は分化能を維持した状態で分裂するが、分化に伴い特有の遺伝子発現が開始され増殖能を失う。幹細胞の分化誘導後の H2AS40Gc 領域を決定する。

(4) H2AS40Gc がグルコース濃度に影響を受けるか否かを調べる。細胞に取り込まれたグルコースの 2-5% は、ヘキソサミン生合成経路によりタンパク化学修飾の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 供与体である UDP-GlcNAc となる。栄養とエピゲノムを結びエピジェネティクスであることを確認できる。

### 3. 研究の方法

(1) クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) によるゲノム・ワイドなヒストン GlcNAc 修飾解析を行い、H2AS40Gc 標的領域 (遺伝子領域、非遺伝子領域、エクソン/イントロン境界域、繰り返し配列等) の特性を明らかにする。

(2) 免疫組織化学およびウェスタンブロット解析を行い標的領域の GlcNAc 修飾の幹細胞における生物学的意義を探る。

(3) H2AS40Gc の機能解析のため、標的領域の遺伝子発現との関連を調べる。また、ゲノムダメージへの影響と細胞外グルコース

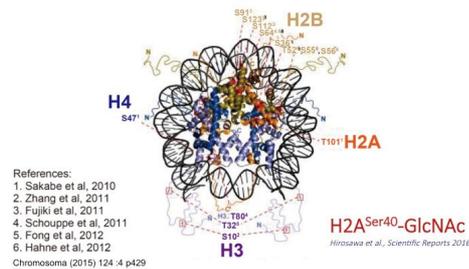
濃度に対する反応も調べる。

(4) 上記 (1)-(3) の結果、H2AS40Gc はゲノム修復能を有する可能性が浮上した。この機能を ES 細胞を用い追求する。

### 4. 研究成果

#### (1)ヌクレソーム構造と H2AS40Gc の特徴。

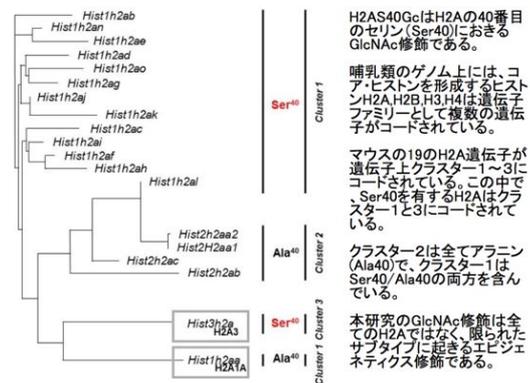
これまでに 13 のヒストン GlcNAc 修飾が報告されている。H2AS40Gc の興味深い点は、GlcNAc 化される Ser40 が L1 領域に存在することである。L1 は H2A、H2B、H3、H4 からなる 4 量体ヒストンが 2 つ集まり、ヒストン 8 量体を形成するとき、H2A 同士の間合する位置にある。H2AS40 が GlcNAc 化されるかどうかで、ヌクレソームの構造が変わる可能性が生じる。この発見は H2AS40 の機能について考える基盤となる (Hirosawa et al., *Sci Rep*, 2016)。



これまでに13のヒストンGlcNAc修飾が報告されている。ヒストンH2Aの40番目のアミノ酸(Ser40)のGlcNAc修飾(H2AS40Gc)は、ヌクレソームの8量体ヒストン内で2つのH2Aが会合するL1領域に存在している。多くの既知のヒストン修飾がテイル部の修飾であることと異なり、GlcNAc化されるL1領域はヒストン球状部である。

#### (2)ヒストン修飾の中で H2AS40Gc は H2A サブタイプに限られる特徴がある。

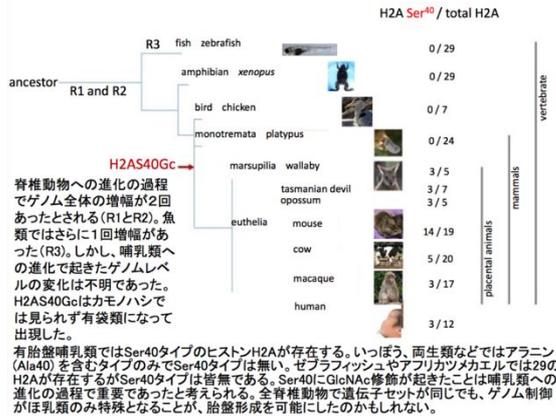
既知のヒストン修飾は全てのヒストンに見られるのが一般的である。ヒストン分画の液体クロマトグラフィー解析とウェスタンブロットや MS 解析より、H2AS40Gc は一部のヒストン H2A 分画に限られていることが明らかになった。マウスゲノム上には H2A 遺伝子クラスターとして GlcNAc 修飾部位である Ser40 を有する H2A サブタイプと Ala40 タイプが、それぞれ複数存在するためである (Hirosawa et al., *Sci Rep*, 2016)。



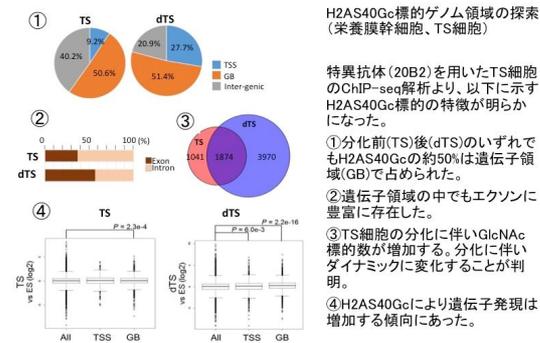
#### (3) H2AS40Gc は哺乳類特有である (予想外の研究成果)。

GlcNAc 化される 40 番目

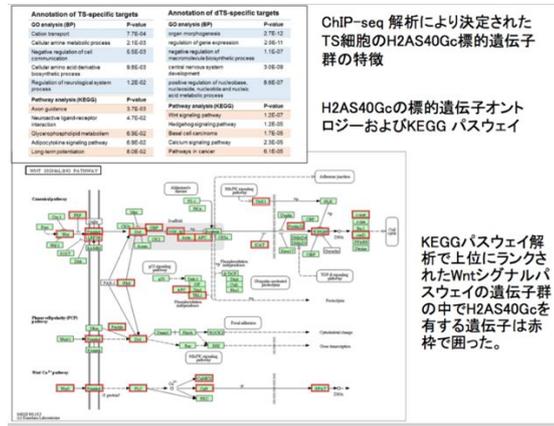
の Ser(Ser40)をゲノム情報データベースで確認すると、Ser40を有するヒストン H2A は哺乳類特有であることが判明した。H2AS40Gc は哺乳類の進化に伴い獲得された新たなヒストン修飾である。MS 解析や GlcNAc を認識する非特異抗体で H2AS40Gc の検出が困難であったことは、Ser40を有する H2A 自体が限られており、既知のヒストン修飾と比べて H2ASer40 の GlcNAc 修飾の総量が少ない理由となる (Hirosawa et al., *Sci Rep*, 2016)。



**(4) TS 細胞におけるゲノム・ワイド H2AS40Gc 標的の特徴。** H2AS40Gc の標的領域をマウス TS 細胞で解析した結果、標的の約 50% は遺伝子領域に存在することが明らかになった。遺伝子領域内で特にエクソンに豊富であることが明らかとなってきた。また、H2AS40Gc 修飾は TS 細胞の分化に伴い増加し、遺伝子発現に促進的なエピジェネティクス修飾であることも分かった (Hirosawa et al., *Sci Rep*, 2016)。



**(5) TS 細胞について分化誘導後の H2AS40Gc は栄養膜細胞の分化関連遺伝子を含む。** ChIP-seq 解析により決定されたこれらの TS 細胞の H2AS40Gc 標的遺伝子群の特徴に加え、H2AS40Gc 標的遺伝子オントロジーおよび KEGG パスウェイ解析により TS 細胞の未分化時と分化時の遺伝子領域が浮かび上がった。その例として、Wnt シグナルパスウェイの遺伝子群 (図の赤枠) が挙げられる。正常発生のみならず、がん化との関連も示唆される (Hirosawa et al., *Sci Rep*, 2016)。

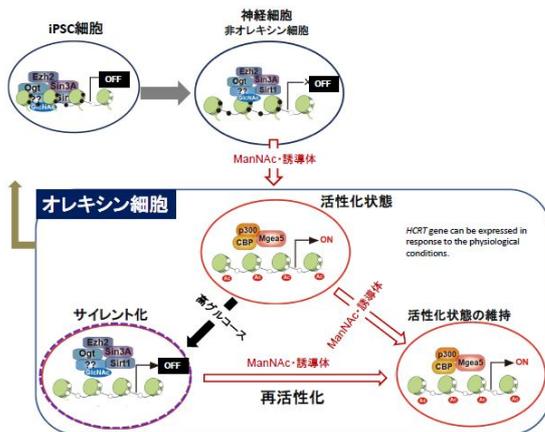


**(6) H2AS40Gc 標的が遺伝子領域に豊富であることは普遍的特徴である。** TS 細胞で得られたゲノム・ワイド解析で浮上した H2AS40Gc の特徴について、マウス ES 細胞を用いて解析した。その結果、ES 細胞でも H2AS40Gc 標的は遺伝子領域に豊富で、エクソンへの偏りをもって存在していることが確認された。遺伝子領域に豊富なヒストン修飾として H3K36 メチル化が知られている (論文投稿中)。

**(7) 既知のエピゲノム情報との比較解析からゲノムダメージ・修復関連が推測された。** 幸いに ES 細胞では既存のヒストン修飾情報は蓄積しており、H3K36 メチル化情報が報告されている (TS 細胞での報告は無い)。そこで、ES 細胞で得られた H2AS40Gc 情報を既知のヒストン修飾情報と比較解析した。その結果、約 50% の H2AS40Gc は H3K36 メチル化とオーバーラップしていた。また驚いたことに、 $\gamma$ H2AX およびアセチル化 H2AZ と標的を共有していることも判明した (論文投稿中)。H2AX および H2AZ はゲノム修復機能を有するヒストンバリエーションである。したがって、H2AS40Gc はゲノム修復能を有する可能性が浮上してきた (論文投稿中)。

**(8) H2AS40Gc はグルコース反応性で、その反応性は細胞の種類で異なる。** 通常 ES 細胞は 25 mM グルコースを含んだ培地(高グルコース培地)で培養されている。一般の培地では、血液中の濃度を考慮してグルコース濃度は 5 mM 程度(低グルコース培地)である。ES 細胞は経験的に高グルコース培地で飼育されており、低グルコース培地で飼育すると分化能が損なわれる。ES 細胞を低グルコース培地で培養し、H2AS40Gc 修飾について免疫染色法・ウェスタンブロッティング、ChIP-seq 解析を行った結果、低グルコースで H2AS40Gc 化が増加することが明らかになった。一方、TS 細胞や体細胞 (血管内皮細胞など) ではグルコース濃度を上げると H2AS40Gc 化も増加した (論文投稿中)。

**(9) ヒトオレキシン細胞の誘導。**先のマウス ES 細胞からオレキシン細胞の誘導に続いて、本実験でもヒト iPS 細胞を誘導することに成功した。その過程でオレキシン細胞の誘導にヒストン GlcNAc 化が関与していることを証明した。また、誘導されたヒトオレキシン細胞は、高グルコース下ではオレキシン遺伝子(HCRT 遺伝子)がサイレントになる(その結果オレキシン細胞が消失する)が、ManNAc およびその誘導体により同遺伝子は再活性化され、オレキシン細胞も再出現することも示された(論文投稿中)。

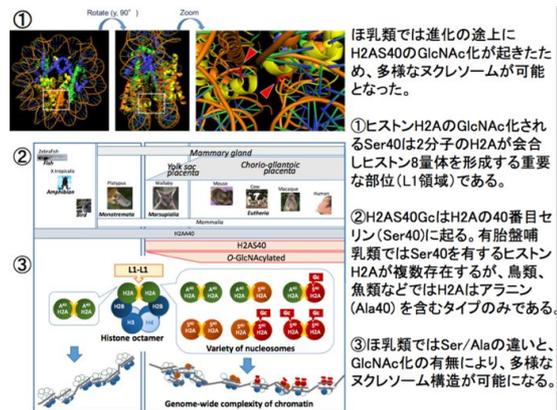


**(10) H2AS40Gc はゲノム修復機能を有する(予想外の研究成果)** ES 細胞では興味深いことに H2AS40Gc 化が H2AX および H2AZ と共にダメージ部位に集積していた。さらにトポイソメラーゼ阻害剤 (CTP, ETP) で処理しゲノムダメージを誘導すると H2AS40Gc 化も増加することがウェスタンブロッティングと免疫組織化学実験から明らかになった。H2AS40Gc はグルコース感受性で変動することを利用してゲノムダメージを調べた結果、H2AS40Gc が増加したとき ES 細胞ではゲノムダメージが阻止されることが判明した(論文投稿中)。

**(11) H2AS40Gc はヒストンバリエーション(H2AX や H2AZ) と共にゲノムダメージ修復に関わる。**野生型 H2AS40 タイプ(GlcNAc 化される)と変異体 H2AS40A (GlcNAc 化されない)を発現させた ES 細胞を用いた実験から H2AS40Gc がゲノム修復機能を有していることが確認された。免疫沈降実験などを組み合わせた実験より、H2AS40Gc はゲノムダメージ初期にはアセチル化 H2AZ と、中期～後期にかけては  $\gamma$ H2AX と複合体を形成し修復作用を発揮していることも判明した(論文投稿中)。さらに興味深いのは、GlcNAc 化され得る H2AS40 タイプの H2A には、通常の H2A (Ala40 を含む)と異なり細胞周期を通じて発現されるサブタイプも存在することである。

**(12) 哺乳類の進化における H2AS40Gc の位置付け。**H2AS40Gc はグルコース依存性

である。加えてデータの蓄積で浮上してきた予想外の展開が、H2AS40Gc が哺乳類特異的で、H2AS40Gc がゲノム修復能を有することである。哺乳類では Ser40 以外に、Ala40 を有する H2A が存在する。生物の有する H2A の殆どは Ala40 タイプであるのに対して、哺乳類では Ser40 も有している。したがって、哺乳類ではヌクレソームは H2ASer40 で GlcNAc 化の有無と、H2ASAla40 であるか否かの組み合わせも生じる。哺乳類ではヌクレソームの多様性が飛躍的に増すことになる。興味は、L1 はヒストンの球状部の表面に存在していることになる。いわゆるヒストンテールの多くのヒストン修飾とは異なるのである。このように特徴的な H2AS40Gc がゲノム修復能を持つこと、グルコース依存性であることは哺乳類進化の上で重要な出来事である。広く生物界でゲノム修復に関わることが知られている DNA photolyase は哺乳類では変異により機能を失っている。それに代わり哺乳類では H2AS40Gc が獲得・保持されている。当初予想できなかった発見である。



**<まとめ>**

近年、ヒストンの GlcNAc 化は新たなエピジェネティクス制御系として注目されている。申請者らは新規ヒストン修飾 [N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 修飾] を発見した。本研究では、この新規ヒストン H2A サブタイプの GlcNAc 修飾を解析し、ヒストン H2A の 40 番目セリンの N-アセチルグルコサミン修飾 (H2AS40Gc) は哺乳類特異であり、ヌクレソーム構造に重要な L1 領域に存在することを確認した。次に TS 細胞のゲノム・ワイドなヒストン GlcNAc 修飾解析を行い、H2AS40Gc は緩んだクロマチン領域に豊富で転写促進的に機能していること、さらに H2AS40Gc は、グルコース感受性でマウス栄養膜幹細胞や胚性幹細胞の分化に伴い劇的に変化すること、加えてゲノム修復機能を有するという予想外の機能も明らかになった。H2AS40Gc は有胎盤動物の代謝とゲノム正常性維持を結ぶ、進化上獲得されたエピジェネティクス系と位置付けられる。以上、本研究より、新規ヒストン GlcNAc 化である H2AS40Gc の役割と機能が明らかになった。ヒストン GlcNAc 修飾の幹細胞における生物

学的意義が深まり基礎生物学に貢献した。本成果は、新たな細胞誘導系や生殖生理学にも新たな視点を提供できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

Hirosawa M, Hayakawa K, Yoneda C, Arai D, Shiota H, Suzuki T, Tanaka S, Dohmae N, Shiota K.

Novel O-GlcNAcylation on Ser(40) of canonical H2A isoforms specific to viviparity.

*Sci Rep* 6: 31785, 2016.

doi: 10.1038/srep31785 (査読あり)

Tani R, Hayakawa K, Tanaka S, Shiota K.

Linker histone variant H1T targets rDNA repeats.

*Epigenetics* 11(4): 288-302, 2016.

doi: 10.1080/15592294.2016.1159369 (査読あり)

Arai Y, Hayakawa K, Arai D, Ito R, Iwasaki Y, Saito K, Akutsu K, Takatori S, Ishii R, Hayashi R, Izumi S, Sugino N, Kondo F, Horie M, Nakazawa H, Makino T, Hirosawa M, Shiota K, Ohgane J.

Putative Epimutagens in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples Identified Using Human Induced Pluripotent Stem Cells.

*Biomed Res Int* 2015: 876047, 2015.

doi: 10.1155/2015/876047 (査読あり)

Ito S, Hirabayashi K, Moriishi K, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Matsuura Y, Shiota K, Yagi S.

Novel sex-dependent differentially methylated regions are demethylated in adult male mouse livers.

*Biochem Biophys Res Commun* 462(4): 332-8, 2015.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.137 (査読あり)

Hayakawa K, Himeno E, Tanaka S, Kunath T.

Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells.

*Curr Protoc Stem Cell Biol* 32:1E.4.1-32, 2015.

doi: 10.1002/9780470151808.sc01e04s32 (査読なし)

Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, Shiota K, Fujita T.

Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney.

*J Am Soc Nephrol* 26(10): 2388-97, 2015.

doi: 10.1681/ASN.2014070665 (査読あり)

Arai D, Hayakawa K, Ohgane J, Hirosawa M,

Nakao Y, Tanaka S, Shiota K.

An epigenetic regulatory element of the Nodal gene in the mouse and human genomes.

*Mech Dev* 136: 143-54, 2015.

doi: 10.1016/j.mod.2014.12.003 (査読あり)

Tachibana Y, Sakurai T, Bai H, Shiota K, Nambo Y, Nagaoka K, Imakawa K.

RNA-seq analysis of equine conceptus transcripts during embryo fixation and capsule disappearance.

*PLoS One* 9(12): e114414, 2014.

doi: 10.1371/journal.pone.0114414 (査読あり)

Kuwahara M, Ito K, Hayakawa K, Yagi S, Shiota K.

N-Acetylmannosamine improves sleep-wake quality in middle-aged mice: relevance to autonomic nervous function.

*Auton Neurosci* 187:56-62, 2015.

doi: 10.1016/j.autneu.2014.11.005 (査読あり)

Tanaka S, Nakanishi MO, Shiota K.

DNA methylation and its role in the trophoblast cell lineage.

*Int J Dev Biol* 58(2-4): 231-8, 2014.

doi: 10.1387/ijdb.140053st (査読あり)

〔学会発表〕(計12件)

塩田邦郎. 日本食評価エピジェネティクス研究: その魅力とその実証に向けて. 第3回みそサイエンス研究会総会. 2016年6月7日. マリオット銀座東武ホテル、東京(招待講演)

塩田邦郎. H2AS40-GlcNAc modification specific to placental animals. RIKEN Epigenetics 2017. 2017年2月17日. 理研バイオリソースセンター、茨城(招待講演)

塩田邦郎. 新たなヒストン H2A-GlcNAc 修飾: Canonical Subtypes vs. Variants. 第4回ヒストンバリエーション研究会. 2017年2月11日. 東北大学青葉山キャンパス、宮城(招待講演)

廣澤瑞子. 糖による新たなヒストン修飾を発見. 平成28年度農学系研究科研究交流会. 2016年11月14日. 東京大学農学部弥生講堂アネックス、東京・文京区

廣澤瑞子、他. ヒストン H2A の L1 領域におけるアイソフォーム特異的な新規 O-GlcNAc 修飾. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日. パシフィコ横浜、神奈川

早川晃司、他. ヒストン H2A O-GlcNAc 修飾による哺乳類特有 DNA 修復機構. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日-12月2日. パシフィコ横浜、神奈川

Kunio Shiota. Epigenetic switching by

hexosamine biosynthesis pathway. Seminar in the reproduction series in Cornell University. 2015年3月11日. Ithaca, U.S.A (招待講演)

Koji Hayakawa, Kunio Shiota. Glucose causes neurodegeneration in induced orexin neurons. The 2014 ASCB/IFCB meeting. 2014年12月6 - 10日. Philadelphia, U.S.A

Kenta Nishitani, et al. O-linked N-acetylglucosamine transferase accumulates at Mgea5, -N-acetylglucosaminidase gene loci in mouse trophoblast stem cell. The 2014 ASCB/IFCB meeting. 2014年12月6 - 10日. Philadelphia, U.S.A

Chikako Yoneda, et al. The influence of glucose concentration on the pluripotency of mouse embryonic stem cells. The 2014 ASCB/IFCB meeting. 2014年12月06 - 10日. Philadelphia, U.S.A

早川晃司. 単糖によるオレキシン神経誘導の多重エピジェネティック制御. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月15 - 18日. 国立京都国際会館、京都 (招待講演)

塩田邦郎. 代謝を感知するゲノム制御・GlycoEpigenetic の展開. 東京理科大学生命科学研究科セミナー. 2014年10月9日. 東京理科大学、千葉 (招待講演)

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

名称：グルコース感受性細胞の保護剤  
発明者：塩田邦郎、早川晃司、廣澤-高森瑞子、藤井遼介、伊藤幸成  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/060882  
出願年月日：2016年4月1日  
国内外の別：国外

名称：糖感知エピゲノムバイオマーカー  
発明者：塩田邦郎、廣澤瑞子、早川晃司  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/076497  
出願年月日：2016年9月8日  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩田邦郎 (SHIOTA, Kunio)  
早稲田大学・理工学術院総合研究所・上級

研究員  
研究者番号：80196352

### (2) 研究分担者

廣澤瑞子 (HIROSAWA, Mitsuko)  
東京大学・農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：60533982

早川晃司 (HAYAKAWA, Koji)  
東京大学・農学生命科学研究科・特任助教  
研究者番号：50636800  
(平成27年度)

新井大祐 (ARAI, Daisuke)  
早稲田大学・理工学術院総合研究所・次席  
研究員  
研究者番号：20624951  
(平成28年度)

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし